

survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡的实验

尹青¹, 黄浩²

Apoptosis in HeLa Cells Induced by Antisense Oligodeoxynucleotide of Human survivin Gene

YIN Qing¹, HUANG Hao²

1. Department of Obstetrics & Gynecology, Liyuan Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Center of Experimental Medicine, Wuhan First Hospital

Abstract Objective To investigate the apoptosis in HeLa cell induced by antisense oligodeoxynucleotide of human survivin gene, and the relation between this apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax. **Methods**

In vitro experiments, TUNEL staining method was used to detect the apoptosis status of cervical cancer HeLa cell line treated by antisense oligodeoxynucleotide of survivin. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of apoptosis-relation gene Bcl-2 and Bax. **Results** Antisense oligodeoxynucleotide of survivin was able to induce the apoptosis in HeLa cells. Antisense oligodeoxynucleotide of survivin can reduce the expression of apoptosis-relation gene Bcl-2 and increase the expression of apoptosis-relation gene Bax. **Conclusion** Antisense oligodeoxynucleotide of survivin was able to induce the apoptosis in HeLa cell. This apoptosis may be mediated by down-regulation of apoptosis-regulated gene Bcl-2 and up-regulation of Bax.

Key words: Antisense oligonucleotides; Cervical cancer; HeLa cell line; Apoptosis

摘要:目的 探讨 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞发生凋亡的可能性,揭示该凋亡发生与 Bcl-2 和 Bax 之间的关系。方法 采用 TUNEL 染色法,研究 survivin 反义核酸与 HeLa 细胞凋亡的关系;通过免疫组织化学法检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 survivin 反义核酸在体外能诱导 HeLa 细胞凋亡,下调 Bcl-2 的表达,增强 Bax 的表达。结论 诱导 HeLa 细胞凋亡是 survivin 反义核酸抗 HeLa 作用的机制之一, survivin 反义核酸可能通过下调 Bcl-2 的表达,增强 Bax 的表达,诱导 HeLa 细胞发生凋亡。

关键词:反义核酸; 宫颈癌; HeLa 细胞; 凋亡

中图分类号: R737.33; R73-36 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)11-0791-02

0 引言

survivin 是近年来发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族的一个新成员,是抑制细胞凋亡的重要成分,在恶性肿瘤的发生发展中起着重要作用^[1]。已有研究结果表明 survivin 在 HeLa 细胞中呈高表达,且其表达程度与恶性程度和侵袭转移能力密切相关^[2]。因此抑制 survivin 的表达可望成为治疗宫颈癌的有效手段。我们合成了针对人 survivin 基因的反义、正义核酸,通过 TUNEL 染色法,在体外定性、定量地研究 survivin 反义核酸与 HeLa 细胞凋亡的关系;同时通过免疫组织化学法检测凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达,研究 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HeLa 细胞株,购自武汉大学生命科学院。细胞凋亡原位检测试剂盒、SABC 试剂盒和 Bcl-2、Bax 单抗,均为中山生物公司产品。survivin(反义): 5'-CCCA GCCTTCCA GCTCCTTG-3'; survivin(正义): 5'-GTTCCCTCGACCTTCCGACCC-3',均经计算机网上检索与 survivin 基因以外的已知人类基因无同源性。由上海生物工程公司合成,全硫代修饰。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞贴壁生长于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 u/ml 和链霉素 100 mg/ml 的 RMPF1640 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,每两天换一次液,当 80% 细胞融合时传代培养。所有实验均采用处于指数生长期的细胞。

1.2.2 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡(TUNEL 染色法)置盖玻片于 6 孔细胞培养板内。

收稿日期: 2007-09-18; 修回日期: 2008-06-27

作者单位: 1. 430077 武汉, 华中科技大学附属梨园医院妇产科; 2. 武汉第一医院实验中心

作者简介: 尹青(1963-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究

取指数生长期的 HeLa 细胞(细胞数为 10^5 /ml) 0.4 ml 铺于盖玻片上。37 °C 孵育,待细胞贴壁生长。各孔内另加含 survivin 反义核酸 $10 \mu\text{mol/L}$ 培养液 3 ml,与细胞共育,时间分别为 24、36、48、72 h。每个时间组均设 PBS 对照孔。弃去孔内培养液,10%甲醛固定。PBS 缓冲液洗涤后,0.3%过氧化氢-甲醇溶液及预冷的 0.1% Triton-X100 处理细胞。DAB 显色。染色后细胞核呈棕褐色的细胞被判为凋亡细胞。随机选取 50 个高倍镜视野(>1000 个细胞),凋亡指数 $AI = \text{凋亡细胞数} \div \text{总细胞数} \times 100\%$ 。

1.2.3 免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 细胞处理同上,将 survivin 反义核酸与细胞分别共育 24、36、48、72 h,弃去孔内培养液,10%甲醛固定。柠檬酸盐缓冲液洗涤后,微波处理 10 min。DAB 显色。光镜下观察。Bcl-2 和 Bax 阳性反应为黄色到棕褐色,定位于胞浆亦可见于胞膜和核膜。

1.2.4 统计学方法 所有数据按 Ridit 分析法处理。

2 结果

2.1 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡

光镜下检查可见,经 survivin 反义核酸($10 \mu\text{mol/L}$)处理后,HeLa 细胞凋亡数明显增加,见表 1。棕褐色染色颗粒定位于细胞核内。染色阳性的 HeLa 细胞出现细胞核碎裂,核质固缩,细胞膜突出形成质膜小泡等凋亡细胞形态学变化。

表 1 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡数(n=7)
Tab 1 The apoptosis induced by anti-sense oligodeoxynucleotide of survivin in cervical cancer

时间	正义核酸处理组	反义核酸处理组	t	P
24 h	3.22 ±1.31	4.32 ±3.21	5.981	<0.05
36 h	3.19 ±1.09	7.68 ±2.65	5.979	<0.05
48 h	3.24 ±1.46	11.28 ±2.37	5.986	<0.05
72 h	3.18 ±1.52	13.14 ±2.59	5.983	<0.05

2.2 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

survivin 正义核酸处理组的 HeLa 细胞中,Bcl-2 蛋白产物染色呈 +++~++++(其中 3 例标本为 ++,4 例标本为 +++),survivin 反义核酸($10 \mu\text{mol/L}$,24 h)处理组中,Bcl-2 蛋白产物染色呈 -~+(其中 5 例标本为 -,2 例标本为 +)。经 Ridit 法检验,survivin 反义核酸能使 Bcl-2 蛋白产物表达显著减少($P < 0.05$)。survivin 正义核酸处理组的 HeLa 细胞中,Bax 蛋白产物染色呈 -~+(其中 5 例标本为 -,2 例标本为 +),survivin 反义核酸(10

$\mu\text{mol/L}$,24 h)处理组中,Bax 蛋白产物染色仍呈 +~+++ (其中 3 例标本为 +,2 例标本为 ++,2 例标本为 +++)。经配对 Ridit 法检验,survivin 反义核酸使 Bax 蛋白产物表达增强($P < 0.05$)。

3 讨论

survivin 既能抑制细胞凋亡,又可调节有丝分裂。选择性表达于常见的多种恶性肿瘤,而在癌旁正常组织和成人分化组织中并不表达^[3-4]。可作为一种潜在的药物靶向而引起关注。

我们合成 survivin 的反义、正义核酸,研究其诱导 HeLa 细胞凋亡的功能。结果证实 survivin 反义核酸对 HeLa 细胞具有诱导凋亡作用,并且发现 HeLa 细胞凋亡数随着时间的延长而明显增加,进一步证实 survivin 反义核酸通过诱导细胞凋亡而达到杀伤 HeLa 细胞的作用。

Bcl-2 家族是公认的凋亡抑制基因,可抑制多种因素,如氧自由基和 p53 诱导的细胞凋亡^[5-7]。本研究表明,未经处理的 HeLa 细胞 Bcl-2 大量表达,而经 survivin 反义核酸处理后,Bcl-2 蛋白的表达明显下调;Bax 是 Bcl-2 的同源体。HeLa 细胞中发现 Bax 的表达缺失,而经 survivin 反义核酸处理后,Bax 基因表达增强,使 Bcl-2/Bax 比值减少,这可能是 survivin 反义核酸诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制之一。

参考文献:

- [1] Bourhis E, Hymowitz SG, Cochran AG. The mitotic regulator survivin binds as a monomer to its functional interactor borealin[J]. J Biol Chem, 2007, 282(48):35018-35023.
- [2] Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, et al. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts [J]. Cancer Res, 2007, 67(17):8014-8021.
- [3] Li B, Fan J, Liu X, et al. Suppression of colorectal tumor growth by regulated survivin targeting[J]. J Mol Med, 2006, 84(12):1077-1086.
- [4] Vaira V, Lee CW, Goel HL, et al. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling [J]. Oncogene, 2007, 26(19):2678-2684.
- [5] Li ZB, Wang JY, Jiang B, et al. Benzobijuglone, a novel cytotoxic compound from Juglans mandshurica, induced apoptosis in HeLa cervical cancer cells[J]. Phytomedicine, 2007, 14(12):846-852.
- [6] Wang P, Yan H, Li JC. CREB-mediated Bcl-2 expression in trichostatin-induced HeLa cell apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(1):101-105.
- [7] Huang AC, Lin TP, Weng YS, et al. Ethyl 2-[N-methyl-4-(2-methyl)anilino]-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (JO-T01006) induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells[J]. Anticancer Res, 2007, 27(4B):2505-2514.

[编辑:贺文;校对:周永红]